

## ネコ網膜 OFF 型双極細胞のグルタミン酸応答に関する研究

金沢大学医学部眼科学講座 (主任: 河崎一夫教授)

佐々木 次 壽

若いネコより単離した網膜 OFF 型双極細胞の L-グルタミン酸に対する電流応答をパッチクランプ法を用いて研究した。OFF 型双極細胞の形態学的特徴を持つ細胞を選択し使用した。調べた1196個の双極細胞のうち119個が膜電位を $-46\text{mV}$ に保持した場合にグルタミン酸に対して内向きの電流応答を生じた。グルタミン酸に対する感受性は細胞の各部位のうち樹状突起部で最も高かった。カイン酸と  $\alpha$ -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸 ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate) はグルタミン酸を投与した場合に類似した作用を示した。100 $\mu\text{M}$  の 2-アミノ-4-ホスホノ酪酸 (2-amino-4-phosphonobutyrate) および (1S, 3R)-1-アミノ-サイクロペンテン-1, 3-ジカルボキシル酸 {(1S, 3R)-1-amino-cyclopentane-1, 3-dicarboxylic acid} は電流応答を惹起しなかった。100 $\mu\text{M}$  の L-アスパラギン酸 (L-aspartate) および N-メチル-D-アスパラギン酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) は、灌流液にグリシンを加え Mg イオンを除去しても、電流応答を生じなかった。1 $\mu\text{M}$  以上の 6-シアノ-7-ニトロキノキサリン-2, 3-ジオン (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione) はグルタミン酸の作用に拮抗した。グルタミン酸が活性化するチャネルはアルカリ金属イオンに対し低い選択性を示し、 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  および  $\text{Ca}^{2+}$  に対し透過性を示した。その透過性の比は  $P_{\text{Na}}: P_{\text{K}}: P_{\text{Cs}}: P_{\text{Ca}}=1: 0.94: 1.32: 0.57$  であった。よって OFF 型双極細胞のグルタミン酸受容体は NMDA 型や代謝型ではなく、非-NMDA 型であり、アルカリ金属イオンに対し低い選択性の透過性を示すと考えられる。

**Key words** L-glutamate, off-type bipolar cell, non-NMDA receptor, retina

視細胞の光に対する応答はシナプスを介して二次ニューロンである双極細胞や水平細胞に伝達される。この伝達をもたらすものは視細胞より放出される神経伝達物質で、この物質が二次ニューロンの受容体に結合し信号を伝達する。また1種類の神経伝達物質に対するシナプス後細胞の応答が細胞の種類によって異なるのは、シナプス後細胞にある受容体の神経伝達物質に対する特性がそれぞれ異なるためであると考えられている。

L-グルタミン酸は視細胞より放出される神経伝達物質として広く認識されている<sup>10)</sup>。グルタミン酸は双極細胞に2種類の応答を惹起することが知られている。すなわちグルタミン酸によって ON 型双極細胞は過分極し、OFF 型双極細胞は脱分極する<sup>9)~11)</sup>。ON 型双極細胞においてその応答の機序は以下のように推測されている。グルタミン酸は 2-アミノ-4-ホスホノ酪酸 (2-amino-4-phosphonobutyrate, APB) に感受性のある代謝型グルタミン酸受容体に作用し、G 蛋白質ついでホスホジエステラーゼのカスケードが順次活性化され、細胞内の cGMP 濃度が減少する<sup>9)~11)</sup>。これにより cGMP 感受性チャネルが閉じ、その結果グルタミン酸は ON 型双極細胞の膜抵抗を増大させる。一方 OFF 型双極細胞においては細胞内の cGMP はその応答に必須ではなく、アメリカサンショウウオにおいてグルタミン酸はイオンチャネル型受容体に作用し、チャネルを開口させる。その結果グルタミン酸は OFF 型双極細胞の膜抵抗を減少させ

る<sup>9)~11)</sup>。このことから OFF 型双極細胞は ON 型双極細胞とは全く異なる仕組みでグルタミン酸に反応すると考えられる。

Villa ら<sup>9)</sup>は単離したネコの双極細胞でパッチクランプ法を用いてグルタミン酸による応答を解析した。ネコの双極細胞の90%以上が ON 型の杆体双極細胞であったので、主に ON 型双極細胞の解析が行われ、OFF 型双極細胞に関し詳細には解析されなかった<sup>9)</sup>。本研究においては哺乳類の網膜における視細胞から主に OFF 型双極細胞への信号伝達をより詳細に解明することを目的として、単離した OFF 型双極細胞でのグルタミン酸がもたらす応答をパッチクランプ法を用いて解析した。

## 材料および方法

## 1. ネコ網膜双極細胞標本の作製

体重 1.0~1.5kg の若いネコを用いた。以下の双極細胞標本の作製法は Kaneko ら<sup>14)</sup>の方法に準じた。網膜を色素上皮から剥がしやすくするために動物を約1時間暗順応した後にエーテル吸入によって麻酔し、頸椎を脱臼させ直ちに両眼を摘出した。眼球周囲の付着物を100%  $\text{O}_2$  ガスを通気した Leibovitz の L-15 培地 (Gibco Laboratories Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA) で洗い流し除去した。摘出した眼球を赤道部で半切し、眼球後半部を100%  $\text{O}_2$  ガスを通気した Leibovitz の L-15 培地に浸した。中心領域を中心とした直径 4mm の網膜を

平成7年6月28日受付, 平成7年9月4日受理

Abbreviations: AMPA,  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate; AP-7, DL-2-amino-7-phosphonoheptanoic acid; APB, 2-amino-4-phosphonobutyrate; Asp, L-aspartate; BSA, bovine serum albumin;  $[\text{Ca}^{2+}]_o$ , extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration; CNQX, 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione; EGTA, 5-ethylene glycol-bis

剥離し、この網膜片を実験に供した。網膜片を直ちに100% O<sub>2</sub> ガスを通気した28℃の Leibovitz の L-15培地に5~15単位/ml のパバイン (Worthington Biochemical Corp., Freehold, NJ, USA) にパバインを活性化させるために0.1mg/ml の L-システイン (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を加えた酵素液に20~50分間浸漬した。この間酵素液には100% O<sub>2</sub> ガスを通気した。浸漬する時間とパバインの濃度はパバインの活性に応じて調節した。ついで網膜片を3℃の0.1mg/ml のウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (片山化学, 大阪) を含む Hanks 液 [135mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM HEPES, 10mM ブドウ糖, 1ppm フェノールレッド (関東科学, 東京), pH は 1N NaOH により7.4に調整] で3回洗浄し、酵素液を除いた。つぎに試験管に入った網膜片を先端を丸くした内径約1.5mm のパスツールピペットで静かに出し入れし、細胞を単離した。単離した細胞の浮遊液10μl をプレパラートガラスに塗布し400倍の倍率で鏡検し、単離の進み具合を確認し、その進み具合でパスツールピペットでの出し入れ回数を調節した。底面にカバーガラスをはり付けたペトリディッシュ (Falcon, Oxnard, CA, USA) の内底面をコンカナバリン A (type A, Sigma Chemical Co.) で被覆し、そこに単離された細胞の浮遊液を散布した。先に鏡検した際に浮遊液中の細胞数の多寡も推定できるので、それに基づいて散布する浮遊液の量を調節した。単離された細胞をガラス面に接着させるため、約1時間5℃の低温用培養器に静置した。双極細胞はその特徴的な形態 (比較的に長い軸索とそれに連なる細胞体と樹状突起) により容易に確認された。

## II. 記録方法

実験に供するペトリディッシュを位相差倒立顕微鏡 Diaphoto TMD (日本光学, 東京) に設置し、重力により持続的に0.1mg/ml の BSA を含む Hanks 液で灌流した。細胞を測定に先立ち写真撮影した。以下の手順で双極細胞の膜電流を測定した。微小ガラス電極を細胞膜表面に接触させ、100mm H<sub>2</sub>O の陰圧を微小ガラス電極内に与え、ギガオームシールを得た。次に強いパルス状の陰圧を微小ガラス電極内に与えることにより微小ガラス電極先端が接触している面の細胞膜が破れ、微小ガラス電極内と細胞内が交通した。すなわちホールセルコンフィギュレーション (whole-cell configuration) が得られた。その状態で膜電位固定し、膜電流を記録した<sup>19)</sup>。微小ガラス電極の作製にはパイレックス管 (外径 10mm, 内径 5.5mm) をガラス管製作器 PY-6 (成茂, 東京) で引き伸ばし、外径 1.2mm, 内径 0.8mm のガラス管を作製した。次に微小電極製作器 PP-83 (成茂) で、ガラス管の中央部をコイル状のヒーターの中で軟化させ、2回にわけて重力によって伸張させ微小ガラス電極とした。1度目は外径が 100μm となるよう伸張させ、自然冷却後にその伸張部分の中央部にヒーターを移動させ、再度加熱して引き切った。2回目の加熱の際にヒーターに流す電流を調節することで電極先端の直径を調節できた。本研究では微小ガラス電極の先端が外径 3μm, 内径 1μm となるよう電流値を調節した。微小ガラス電極内の標準的な溶液の組成は 120mM CsCl または KCl, 0.5mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM 5-エチレンジリ

コールビス (β-アミノ-エチルエーテル) N, N, N', N'-四酢酸 [5-ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid, EGTA], 10mM HEPES, 2mM Na<sub>2</sub>ATP (Sigma Chemical Co.), 0.1mM Na<sub>3</sub>GTP (Sigma Chemical Co.), 1mM Na-cGMP (Sigma Chemical Co.) であり、1N の CsOH または KOH でその pH が7.2になるように調整した。カリウム電流の抑制を要する実験では塩化カリウムの代わりに塩化セシウムを用いた。微小ガラス電極先端を Hanks 液に浸し、上記の微小ガラス電極内液を詰めた場合に、その電極抵抗は 20MΩ であった。金魚の網膜双極細胞において、ホールセルコンフィギュレーション完成後に細胞内のイオン濃度と微小ガラス電極内の溶液のイオン濃度が平衡状態に達するのには約2分間を要することから<sup>19)</sup>、本研究ではホールセルコンフィギュレーション完成後2分経過してから測定を開始した。

微小ガラス電極は低雑音電流電圧変換器 CEZ-2100 (日本光電, 東京) に接続された。電圧に変換された信号はベッセルフィルター型ローパスフィルター FV-625A (NF サーキットデザインブロック, 横浜) を通った後マイクロコンピュータ PC-9801RX (日本電気, 東京) に取付けたアナログ-デジタル変換器 ADX-98 (カノーブス, 神戸) でデジタル信号に変換され、ハードディスク内に蓄えられた。フィルターのカットオフ周波数は信号をデジタル変換する際のサンプリング周波数に適合するように調節した。保持電圧の制御は PC-9801RX とそれに取付けたデジタル-アナログ変換器 DAX-98 (カノーブス) で行なった。データはワークステーション VAX3100 (Digital Equipment, Maynard, MA, USA) で処理された。不関電極としては 140mM NaCl, 1% 寒天を含む塩橋に接続した銀-塩化銀電極を用いた。微小ガラス電極と不関電極の液間電位は既に測定されており<sup>19)</sup>、本報では膜電位をそれに従って補正して表示した。記録は室温 (19~22℃) で行なわれた。測定は細胞単離後8時間以内に終了した。

## III. 灌流並びに薬剤投与方法

L-グルタミン酸ナトリウム (片山化学) は電気泳動法や大径ピペットよりの圧投与および急速灌流法を用いて投与された。α-アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾールプロピオン酸 (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate, AMPA) (Sigma Chemical Co.), カイニン酸 (Research Biochemical Inc., Natick, MA, USA), N-メチル-D-アスパラギン酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) (Sigma Chemical Co.), グリシン (和光純薬, 大阪), L-アスパラギン酸 (L-aspartate, Asp) (和光純薬), (1S, 3R)-1-アミノ-サイクロペンテン-1, 3-ジカルボキシル酸 {(1S, 3R)-1-amino-cyclopentane-1, 3-dicarboxylic acid, 1S, 3R, -ACPD} (Tocris Neuramin, Bristol, UK), APB (Research Biochemical Inc.), 6-シアノ-7-ニトロキノキサリン-2, 3-ジオン (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione, CNQX) (Research Biochemical Inc.), DL-2-アミノ-7-ホスホノヘプタン酸 (DL-2-amino-7-phosphonoheptanoic acid, AP-7) (Research Biochemical Inc.) および Cl<sup>-</sup> イオンの置換に用いたメタネンスルホン酸 (和光純薬) は急速灌流法で投与された。

電気泳動法では電気抵抗が 100MΩ となるように先端の直径

(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid; [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>, extracellular K<sup>+</sup> concentration; [Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub>, extracellular Na<sup>+</sup> concentration; NMDA, N-methyl-D-aspartate; PKC, protein kinase C antibody; 1S,3R, -ACPD, (1S,3R)-1-amino-cyclopentane-1,3-dicarboxylic acid; Vh, holding potential

を  $0.1\mu\text{m}$  以下にしたガラスピペット内に  $1\text{M}$  の L-グルタミン酸ナトリウム溶液を詰め、ピペットの先端を細胞の表面になるべく近づけ短時間の ( $50\sim 200\text{msec}$ ) の微小電流 ( $1\sim 35\text{nA}$ ) を流し、グルタミン酸を局所的に投与した。ピペットからのグルタミン酸の漏出を最小限とするためブレーキ電流 ( $3\sim 5\text{nA}$ ) を

常時流した。圧投与ではグルタミン酸ナトリウム溶液を満たした先端の内径  $10\sim 20\mu\text{m}$  のピペットを細胞より  $20\sim 30\mu\text{m}$  離し、ピペットのもう一端を鉱物質油を入れたシリコンチューブとそれにつながる三角コルベンに接続し、三角コルベン内の圧力を  $0.4\text{kg/cm}^2$  に調整した窒素ガスと電磁バルブによって制御

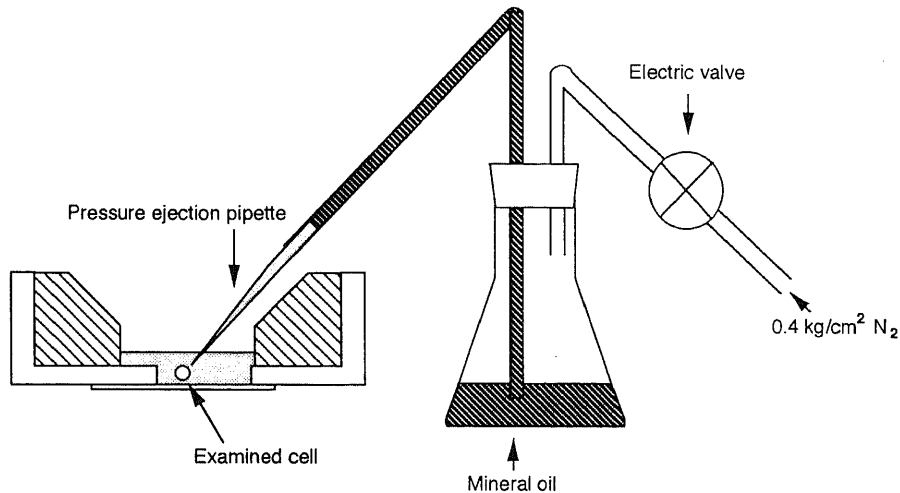


Fig. 1. A schematic illustration of the pressure ejection system. The pipette, the inner diameter of which was approximately  $10\mu\text{m}$ , was filled with Hanks' solution containing sodium glutamate. The pipette tip was positioned to each bipolar cell away from  $20\sim 30\mu\text{m}$ . The opposite end of the pipette was connected via a mineral oil-filled tubing to a reservoir of mineral oil. The reservoir of mineral oil was positioned below the level of the recording chamber lest L-glutamate should leak from the pipette into the vicinity of the bipolar cell. Pressure of  $0.4\text{ kg/cm}^2$  was applied to the oil reservoir, for controlled amounts of time, to eject L-glutamate.

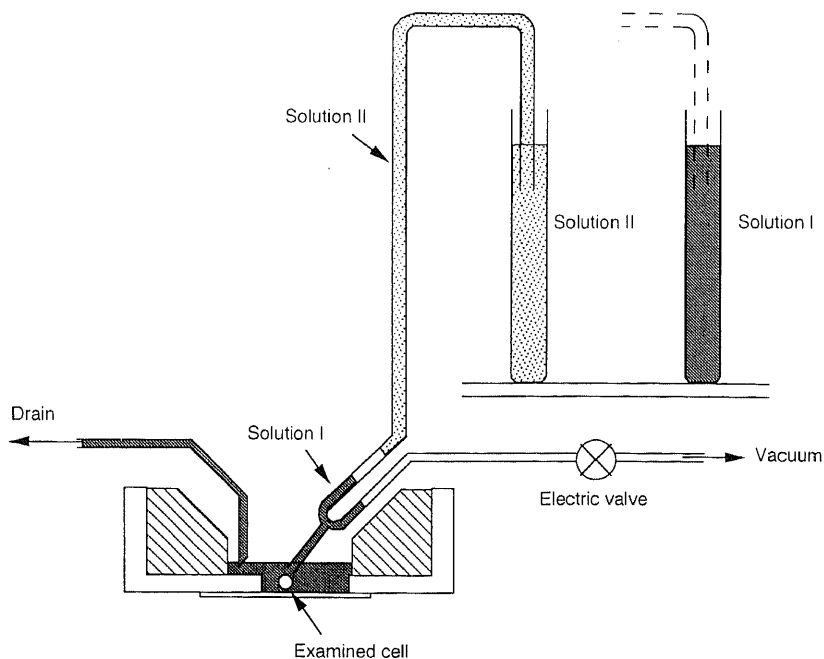


Fig. 2. A schematic illustration of the microflow system. The reservoir of solution was positioned about  $20\sim 30\text{ cm}$  above the level of the recording chamber. This figure illustrates solution switching from solution I to solution II. To switch from solution I to solution II, the tip of tubing was manually moved from reservoir I to reservoir II. During the translocation of tubing, a small air bubble was sucked into the tube. Thus the flow of a new solution was identified visibly. When the air bubble reached the peak of the U-tube, the electric valve was briefly activated. In this way the leading bubble was pulled out to the outlet.

した。ピペットよりの薬剤の漏出を防ぐためピペットには常に陰圧 (10mmH<sub>2</sub>O) を与えた (図1)。急速灌流法 (図2) では、複数種類の灌流液が記録チャンバーより約 20~30cm 高い位置に置かれ、灌流液はU字型のチューブの一端に接続され、記録チャンバー内に流入した。U字型のチューブは外径 2.0mm、内径 1.2mm のポリエチレンチューブでできており、U字の頂点に内径 120 $\mu$ m、長さ 5~7mm のポリエチレンチューブが接続されており、記録チャンバー内への流入路として機能した。記録に先立ちチューブの先端は細胞より約 1mm 離れた位置に置かれ、チューブ先端の方向は灌流液が細胞に直接当たるように向けられた。U字型チューブのもう一端を電磁バルブを介して吸引ポンプに接続した。灌流液を溶液Ⅰから溶液Ⅱに変えるためにはU字型チューブの他端を容器Ⅰから容器Ⅱに移し、移す間にチューブ内の小気泡が溶液Ⅰと溶液Ⅱの間に入るの、その気泡がU字型チューブの先端に達したとき電磁バルブを約 20msec 開くことにより気泡が除かれ、速やかに記録チャンバー内に流入する液が溶液Ⅰから溶液Ⅱに入れ替わった。

電気泳動法では最も急速にグルタミン酸を細胞に投与でき、かつ局所的に投与できるので、これを脱感作や局所的な感度の分布および逆転電位の解析に用いた。圧投与は電気泳動法にみられるような電氣的アーチファクトを伴わずに薬剤を比較的急速に広く細胞に投与できるので、これを逆転電位の測定に用いた。急速灌流法は記録チャンバー内の広い範囲で一定の濃度の薬剤が投与でき再現性が高く、多種の薬剤が投与できるので、これを濃度-応答曲線やグルタミン酸受容体のサブタイプの決定に用いた。

灌流方法は前に述べたようにU字型チューブを用いて行なわれ、液の温度変化を少なくし、記録チャンバー内の灌流液の置換を速やかにするために前記のペトリディッシュにステンレス鋼のリングをいれディッシュ内の容積を減少させ、記録時には記録チャンバー内の灌流液の体積を 0.15ml とした。灌流液はベリスタティックポンプにより持続的に排除された。灌流速度は 0.6ml/min で記録チャンバー内の液の交換には約 1 分間を要した。灌流液の温度は室温と同じにし、記録チャンバー内の灌流液の温度も室温と同じであった。

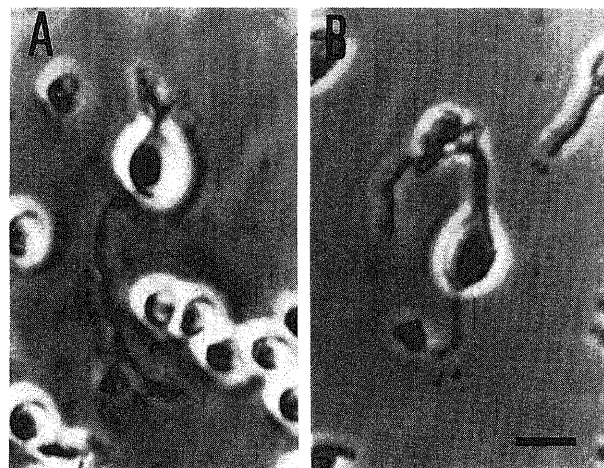


Fig. 3. Solitary bipolar cells dissociated from the cat retina. (A) Rod bipolar cell. (B) Cone bipolar cell. Note the difference of soma size and axon length. Scale bar, 10  $\mu$ m.

このような条件下で測定開始後約 10~30 分間では細胞の極端な形態の変化を認めなかった。しかし高濃度の薬剤を投与した場合などには時間の経過と共に電流は次第に減弱した。記録に用いた双極細胞数は 1196 個であった。本報に示したデータは 3 個以上の細胞より得られたものである。

#### Ⅳ. チャンネルに対する各イオンの相対的透過性の算出法

グルタミン酸が活性化するチャンネルに対する各イオンの相対的透過性を求めるために、細胞内外の各々のイオン環境をほぼ 1 種類として逆転電位を求めた<sup>18)</sup>。各イオンの相対的透過性はこれらの求めた逆転電位と

$$E_{rev} = \frac{RT}{F} \ln \frac{\sum P_X [X]_o}{\sum P_Y [Y]_i}$$

より算出した<sup>18)</sup>。Ca<sup>2+</sup> の相対的透過性は

$$E_{rev} = \frac{RT}{2F} \ln \frac{4P_{Ca} [Ca]_o}{P_{Cs} [Cs]_i}$$

より算出した<sup>18)</sup>。E<sub>rev</sub> は逆転電位を表し、X, Y はイオンの種類、P<sub>X</sub>, P<sub>Y</sub> はそれぞれのイオンの透過性、T は絶対温度、R は気体常数、F はファラデー定数を表す。

### 成 績

#### Ⅰ. 双極細胞の形態学的分類

広範囲の網膜を酵素処理し、任意の双極細胞の膜電位を -46mV に固定した場合には、100 $\mu$ M の圧投与されたグルタミン酸ナトリウム溶液に対し内向きの電流応答を示した双極細胞が測定した双極細胞のうち 3% 存在した。この内向きの電流応答を示した双極細胞は内向き電流応答を示さなかった双極細胞と比べ大きな細胞体と短い軸索を持っていた (図 3 A, B)。よって大きな細胞体と短い軸索を持つ双極細胞を選択した結果、記録可能であった双極細胞のうち 54% が 100 $\mu$ M のグルタミン酸ナトリウムに対して内向き電流応答を示した。

調べた 1196 個の双極細胞のうち、膜電位を -46mV に固定した場合には、灌流投与された 100 $\mu$ M のグルタミン酸ナトリウムに対し 119 個の細胞が内向き電流応答を示し、OFF 型双極細胞であると判定し、これらの細胞を測定に用いた。

#### Ⅱ. OFF 型双極細胞のグルタミン酸に対する応答：濃度-応答曲線

OFF 型双極細胞の膜電位を -46mV に固定した状態で 1~200 $\mu$ M のグルタミン酸ナトリウム溶液を灌流投与した。図 4 A に示すように、グルタミン酸がもたらす内向き電流はグルタミン酸ナトリウムの濃度に依存して増大し、最小有効濃度は 2~3 $\mu$ M であった。図 4 B は 100 $\mu$ M のグルタミン酸ナトリウムによって惹起される電流の大きさを 1 とし、各濃度のグルタミン酸ナトリウムに対する電流の相対的な大きさを示す。図 4 B のように電流応答はグルタミン酸ナトリウム濃度の増加に伴って S 字曲線状に増大し、100 $\mu$ M のグルタミン酸ナトリウムで飽和した。K<sub>d</sub> 値は約 12 $\mu$ M で、Hill 係数は 1.8 であった。

図 4 A に示すように低濃度のグルタミン酸ナトリウム ( $\leq 5\mu$ M) では、少なくとも 2 秒間はその応答に減弱はみられなかった。しかし高濃度のグルタミン酸ナトリウム ( $\geq 100\mu$ M) ではグルタミン酸ナトリウム投与中にもかかわらず応答の振幅が低下し、後で述べたようにこの現象は電気泳動法でグルタミン酸を投与した場合に、より明瞭に認められた (図 7 A)。これは細胞内外のイオン濃度の駆動力によるものではなく脱感作によるものであると考えられる。なぜならば応答の急峻部と平坦部

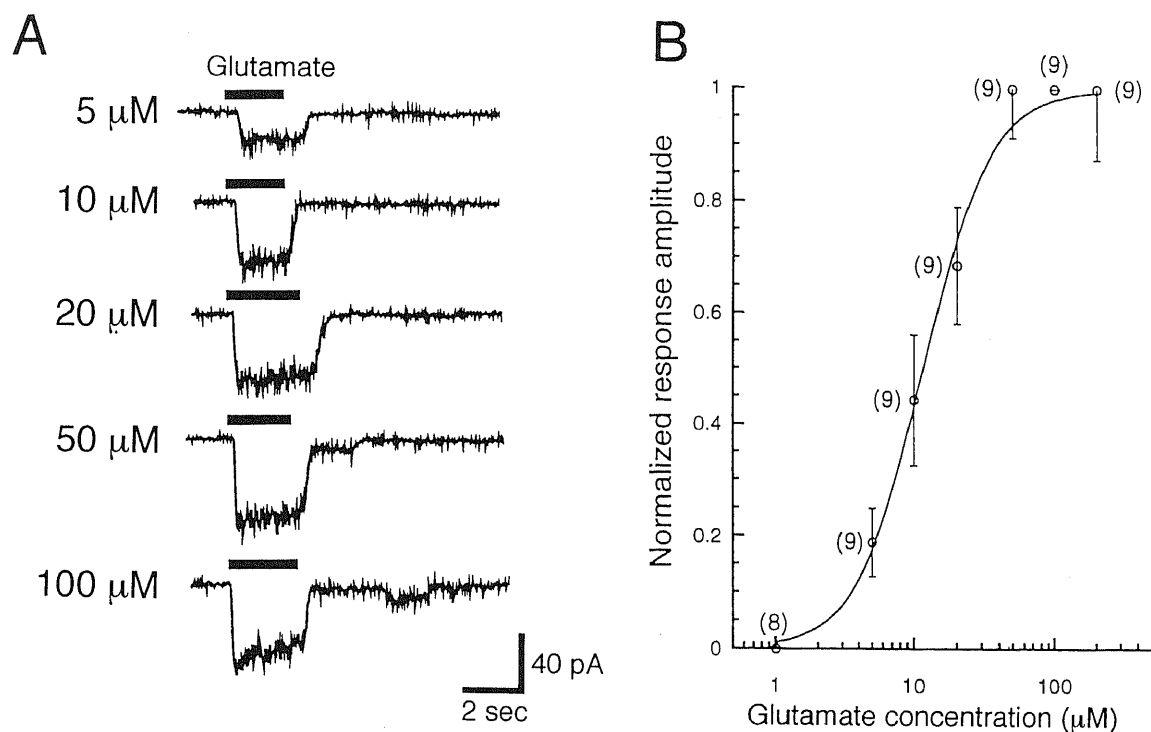


Fig. 4. Glutamate-induced current in isolated off-type bipolar cells. (A) Currents induced in an isolated off-type bipolar cell by various concentrations of glutamate (5~100  $\mu\text{M}$ ) applied by bath application. Holding potential ( $V_h$ ), -46 mV. The timing of glutamate application was indicated by horizontal bars. (B) Dose-response relationship of glutamate-induced current. The average ( $\circ$ ) and standard deviation (short vertical bars) of the initial peak amplitude ratio measured at -46 mV were obtained from a group of cells, a number of which are indicated in parentheses. Data points were fitted by least square method to a Hill's equation with a coefficient of 1.8 and  $K_d$  of 12  $\mu\text{M}$ .

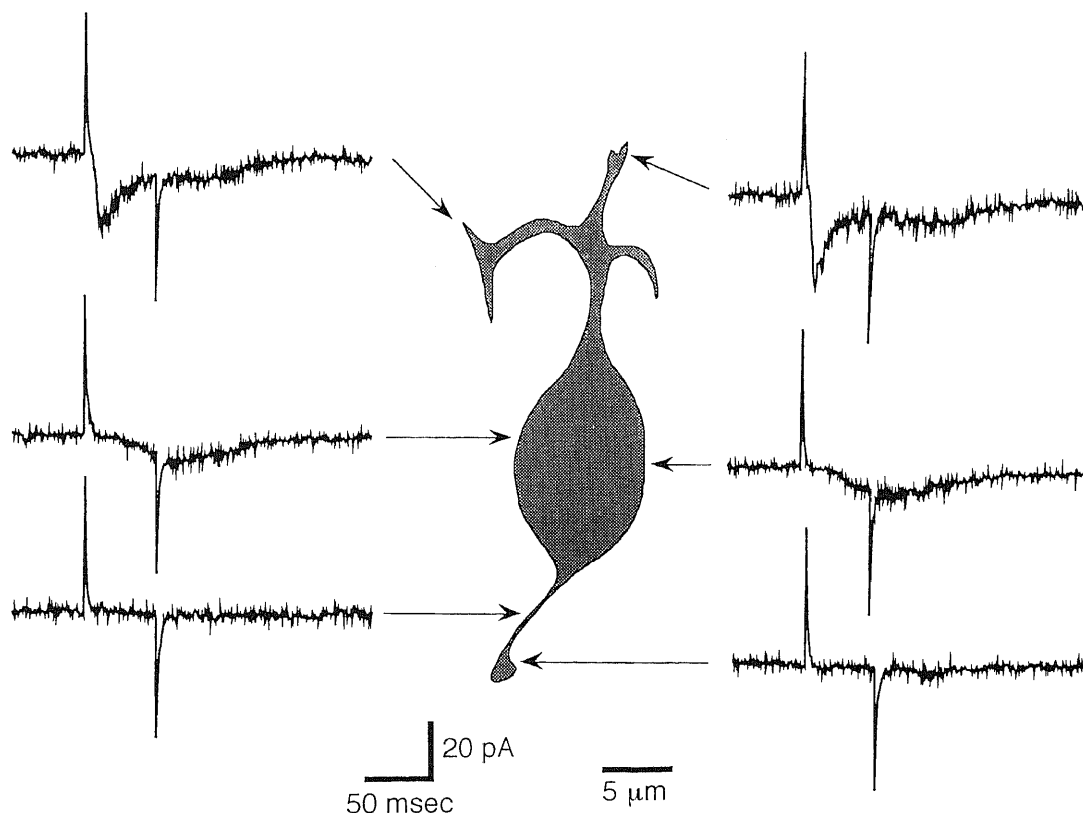


Fig. 5. Spatial distribution of sensitivity of an isolated off-type bipolar cell to glutamate applied ionophoretically (-35 nA, 50 msec; brake current, 5 nA) at various regions of the cell. A pipette filled with 1M L-glutamate was positioned within a few micrometers of the cell membrane under visual control. Holding potential, -46 mV. Pipette tip positions were indicated by arrows. Transients in responses are capacitive artifacts by ionophoresis.

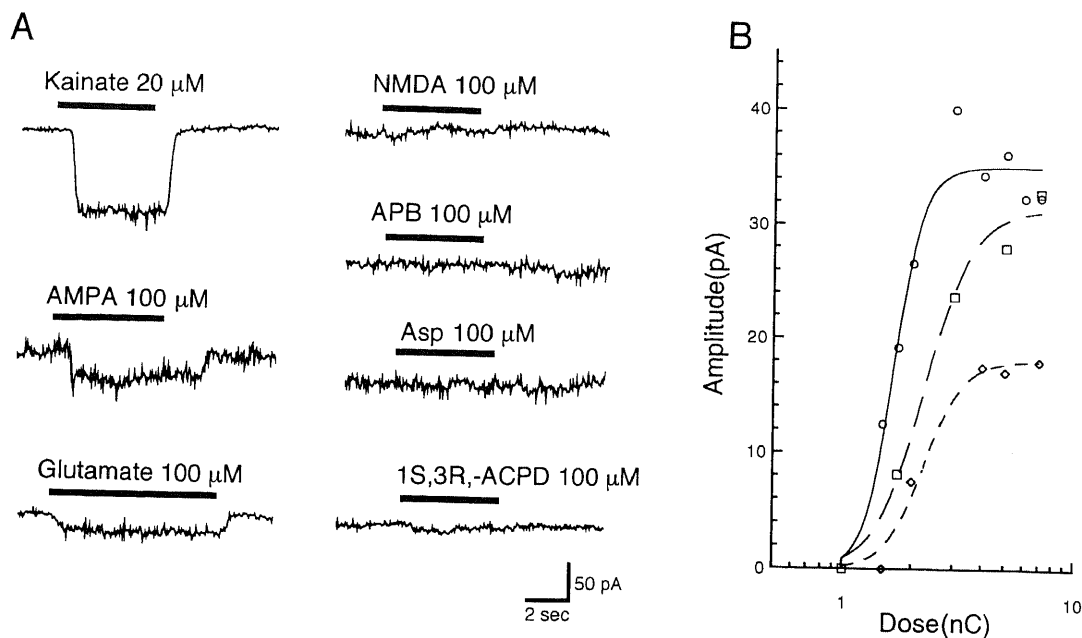


Fig. 6. Effects of glutamate analogues and antagonists on isolated off-type bipolar cells. (A) Responses to 20  $\mu$ M kainate, 100  $\mu$ M  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA), 100  $\mu$ M glutamate, 100  $\mu$ M N-methyl-D-aspartate (NMDA), 100  $\mu$ M 2-amino-4-phosphonobutyrate (APB), 100  $\mu$ M L-aspartate (Asp) and 100  $\mu$ M (1S,3R)-1-amino-cyclopentane-1, 3-dicarboxylic acid (1S,3R,-ACPD). Each chemical was applied by bath application. Horizontal bars indicate timing of chemical application. When NMDA or L-aspartate was applied, the extracellular solution contained 5  $\mu$ M glycine and no magnesium ion. Holding potential,  $-46$  mV. (B) Effects of 1  $\mu$ M 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) on the dose-response relationship of the glutamate-induced current. Glutamate was applied ionophoretically. Peak amplitude of glutamate-induced current was plotted on a semilogarithmic coordinate. The dose of glutamate is the product of intensity (0–35 nA) and duration (200 msec) of ionophoretic current in the control extracellular solution ( $\circ$ ), in the presence of 1  $\mu$ M CNQX ( $\diamond$ ) and in the control extracellular solution for washing out ( $\square$ ). Brake current, 5 nA. Holding potential,  $-46$  mV. Data points were fitted by least square method to a Hill's equation.

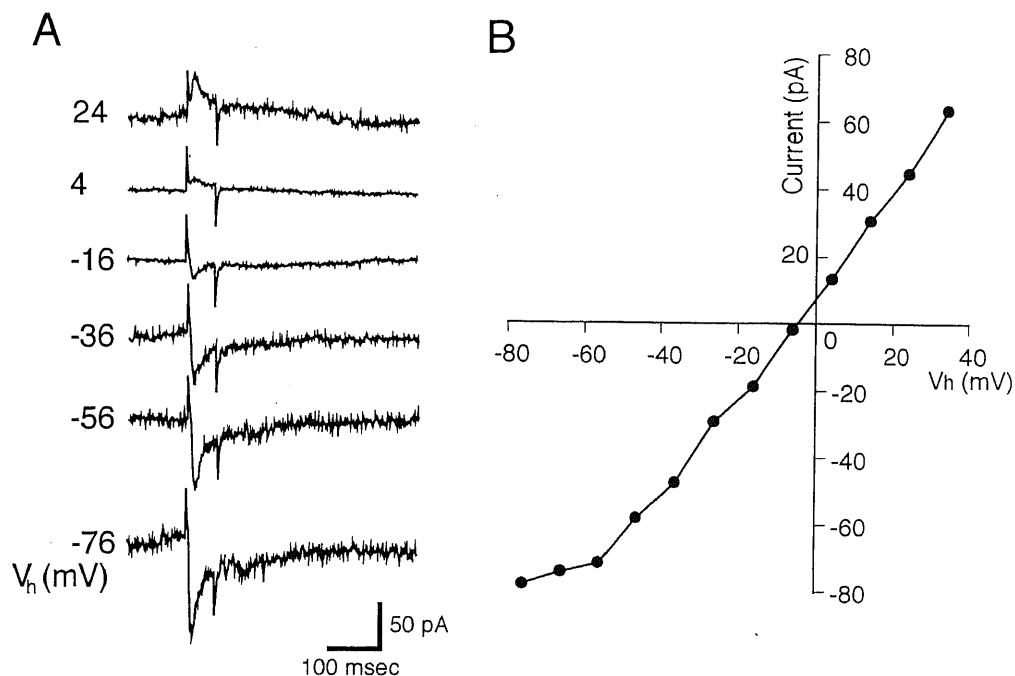


Fig. 7. Effects of holding potential ( $V_h$ ) on glutamate-induced current. (A) Glutamate-induced current at different levels of the  $V_h$ . An isolated off-type bipolar cell was superfused with Hanks' medium. Recording pipette was filled with the solution containing 120 mM CsCl mainly. Holding potentials are indicated to the left of each trace which has been shifted vertically by an arbitrary amount for clarity. L-glutamate was applied ionophoretically ( $-35$  nA, 50 msec; brake current 5 nA) to the dendritic region. Transients in responses are capacitive artifacts by ionophoresis. (B) The relationship between the glutamate-induced current and the holding potential plotted from a different cell.

の逆転電位は同じであったからである。

### Ⅲ. グルタミン酸に対する感受性の分布

OFF 型双極細胞の各部位のグルタミン酸に対する感受性を調べるために、電気泳動法によって細胞の各部位にグルタミン酸を投与し、その応答を調べた ( $n=13$ )。図5に示すようにグルタミン酸を樹状突起部に投与した場合に、最も大きく急速な応答が得られた。細胞体付近にグルタミン酸を投与した場合に、小さく遅い応答が得られた。このことは細胞体付近に投与されたグルタミン酸が拡散して、OFF 型双極細胞のより感受性の高い部位 (樹状突起部) で応答を惹起したことを示唆する。軸索や軸索終末にグルタミン酸を投与した場合には応答は得られなかった。以上より OFF 型双極細胞においてグルタミン酸に対する感受性が最も高い部位は樹状突起部であると考えられる。同様な結果は13個の OFF 型双極細胞で得られた。

### Ⅳ. グルタミン酸受容体のサブタイプ

OFF 型双極細胞のグルタミン酸受容体のサブタイプを決定するために、以下のグルタミン酸類似物質と拮抗薬を灌流投与した ( $n=13$ , 図6)。カニン酸 ( $20\mu\text{M}$ ) と AMPA ( $100\mu\text{M}$ ) は  $-46\text{mV}$  に膜電位を固定した OFF 型双極細胞に内向き電流応答を惹起した。  $100\mu\text{M}$  の APB, Asp, NMDA および 1S, 3R,  $\alpha$ -ACPD ではいずれも応答は生じなかった (図6A)。Asp と NMDA を投与する際にはそれらの溶液に NMDA に対する応答を増強するグリシン ( $5\mu\text{M}$ ) を加え、NMDA に対する応答を抑制する Mg イオンを除去した。

CNQX は非-NMDA 型グルタミン酸受容体の競合的拮抗薬で

あり、  $5\mu\text{M}$  の CNQX を灌流投与しながらグルタミン酸を電気泳動的に投与した場合には、グルタミン酸に対する応答はほぼ抑制された。  $1\mu\text{M}$  の CNQX を灌流投与した場合に投与しなかった場合に比べグルタミン酸に対する応答の振幅は約50%に抑制され、グルタミン酸の濃度-応答曲線は  $1\mu\text{M}$  の CNQX の投与によって、より高濃度の方に移行した (図6B)。  $1\mu\text{M}$  の CNQX の投与にもかかわらず発生したグルタミン酸に対する応答は NMDA 型グルタミン酸受容体を介したものと考える。なぜならばこの際の灌流液には  $1\text{mM}$  の Mg イオンが含まれ、細胞の膜電位は  $-46\text{mV}$  に固定されていたからである。さらに OFF 型双極細胞に NMDA 型グルタミン酸受容体がないことを確認するために、競合的 NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗薬 AP-7 ( $50\mu\text{M}$ ) を灌流投与しながらグルタミン酸を電気泳動的に投与した。灌流液にはグリシン ( $5\mu\text{M}$ ) を加え、Mg イオンを除去した。AP-7 は OFF 型双極細胞のグルタミン酸に対する応答を抑制しなかった。以上の結果から OFF 型双極細胞のグルタミン酸受容体は非-NMDA 型であり、NMDA 型グルタミン酸受容体や代謝型グルタミン酸受容体は存在しないと考えられる。

### Ⅴ. グルタミン酸による膜電流変化のイオンメカニズム

以下ではグルタミン酸による膜電流の変化をグルタミン酸応答と略記する。OFF 型双極細胞のグルタミン酸応答がどのようなイオンにより惹起されるかを調べるために、様々なイオン環境下で膜電位と膜電流の関係を調べた。まず Hanks 液を灌流投与しながら膜電位を  $-76\text{mV}$  から正の方向に段階的に変

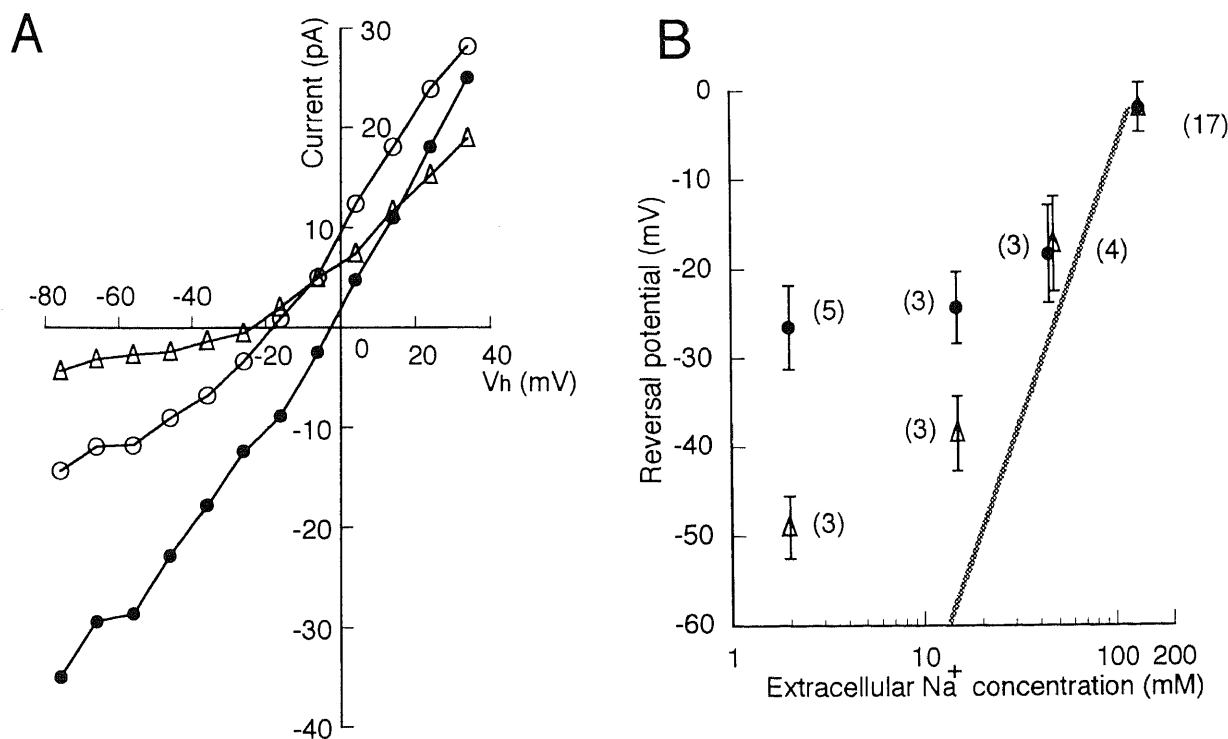
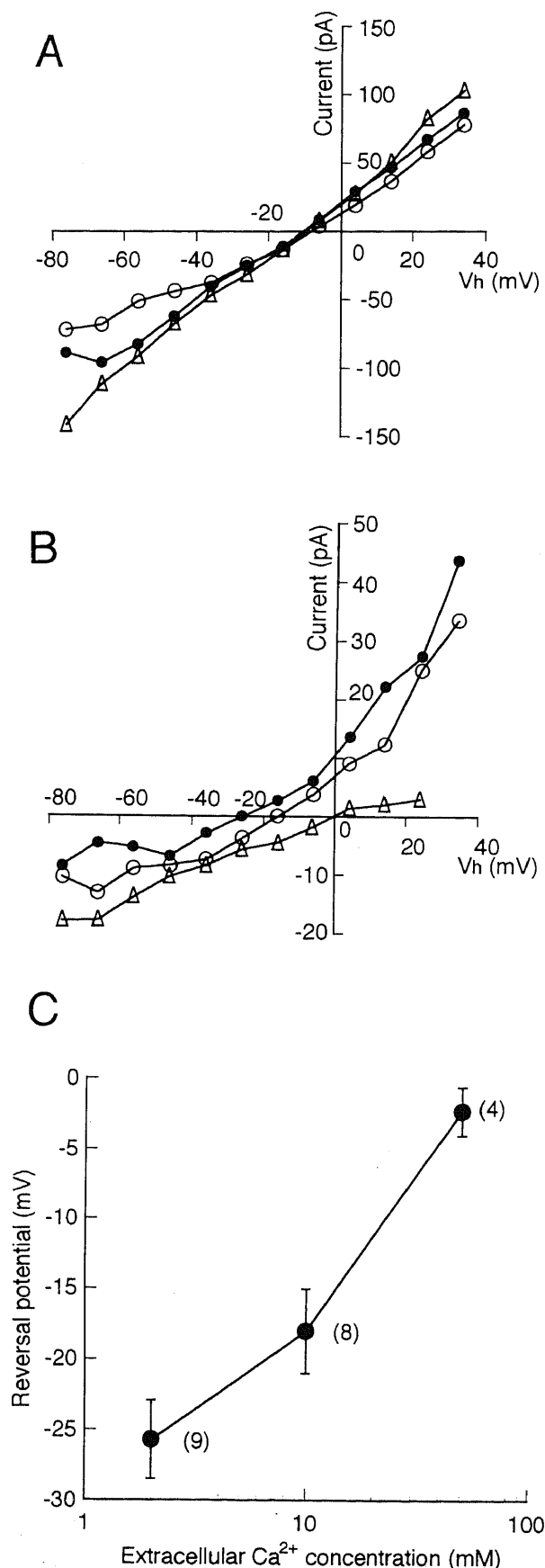


Fig. 8. Effects of extracellular  $\text{Na}^+$  on the glutamate-induced current. (A) The relationship between the glutamate-induced current and the holding potential recorded at extracellular  $\text{Na}^+$  concentrations ( $[\text{Na}^+]_o$ ) of 135 mM (●), 45 mM (○) and 2 mM (△).  $\text{Na}^+$  was replaced with choline. L-glutamate was applied ionophoretically ( $-35\text{ nA}$ , 50 msec; brake current 5 nA) to the dendritic region. (B) Relationship between  $[\text{Na}^+]_o$  and the reversal potential.  $\text{Na}^+$  was replaced with choline (●) or sucrose (△). The number of examined cells are indicated in parentheses. Shaded line represents 57 mV/decade.



化させ、グルタミン酸を電気泳動的に投与した場合に、その電流応答は内向きから次第に減少し、0mV 付近で反転し、正の保持電位では外向き電流応答を示した (図 7 A)。逆転電位は  $-1.9 \pm 2.8 \text{ mV}$  ( $n=17$ ) であった。図 7 B に示すように電圧-応答曲線はほぼ直線状で、約  $-60 \text{ mV}$  以下の深い膜電位に保持した場合に傾きが減少した。灌流液から Mg イオンを除去した場合でも同様の電圧-応答曲線が得られた。この所見からも OFF 型双極細胞のグルタミン酸受容体は非 NMDA 型であると考えられる。

#### 1. Na イオン

$\text{Na}^+$  のグルタミン酸応答に対する関与を調べるために細胞外  $\text{Na}^+$  濃度 (extracellular  $\text{Na}^+$  concentration,  $[\text{Na}^+]_o$ ) を変化させてグルタミン酸応答の振幅と逆転電位を測定した。まず Hanks 液 ( $[\text{Na}^+]_o=135 \text{ mM}$ ) でグルタミン酸応答と逆転電位を測定し、次にコリンで置換することによって  $[\text{Na}^+]_o$  を段階的に減少させ同様の測定を行なった。図 8 A に示すように  $[\text{Na}^+]_o$  を減少させるほどグルタミン酸応答の振幅は減少し、逆転電位は過分極の方向に変化した ( $135 \text{ mM}$   $[\text{Na}^+]_o$  では  $-1.9 \pm 2.8 \text{ mV}$ ,  $n=17$ ;  $45 \text{ mM}$   $[\text{Na}^+]_o$  では  $-18.3 \pm 5.5 \text{ mV}$ ,  $n=3$ ;  $15 \text{ mM}$   $[\text{Na}^+]_o$  では  $-24.3 \pm 4.1 \text{ mV}$ ,  $n=3$ ;  $2 \text{ mM}$   $[\text{Na}^+]_o$  では  $-26.5 \pm 4.7 \text{ mV}$ ,  $n=5$ )。これらの結果から、 $\text{Na}^+$  はグルタミン酸応答の大部分に関与していることが判明した。図 8 B に示すように、 $[\text{Na}^+]_o$  が高い場合 ( $\geq 45 \text{ mM}$ ) にはグルタミン酸応答の逆転電位と  $[\text{Na}^+]_o$  の自然対数値の関係は  $\text{Na}^+$  のみがグルタミン酸応答に関与すると仮定して求めた Nernst の式 ( $57 \text{ mV/decade}$ ) にほぼ一致し、 $[\text{Na}^+]_o$  が低い場合にはそれよりも偏移した。この結果から  $[\text{Na}^+]_o$  が高い場合には  $\text{Na}^+$  はグルタミン酸応答の主成分であり、 $[\text{Na}^+]_o$  が低い場合には  $\text{Na}^+$  以外のイオンがグルタミン酸応答に関与すると考えられる。図 8 B で示すように細胞外の  $\text{Na}^+$  をショ糖で置換した場合には、コリンで置換した場合に比べてより大きな逆転電位の偏移が得られた ( $45 \text{ mM}$   $[\text{Na}^+]_o$  では  $-17.2 \pm 5.3 \text{ mV}$ ,  $n=4$ ;  $15 \text{ mM}$   $[\text{Na}^+]_o$  では  $-38.5 \pm 4.2 \text{ mV}$ ,  $n=3$ ;  $2 \text{ mM}$   $[\text{Na}^+]_o$  では  $-49.0 \pm 3.5 \text{ mV}$ ,  $n=3$ )。この知見より、コリンもグルタミン酸が活性化するチャネルをある程度通過することが判明した。

Fig. 9. Effects of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  on the glutamate-induced current. (A) Current-voltage relationship of the glutamate-induced current at extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations ( $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ) of 2 ( $\Delta$ ,  $\bullet$ ) and 10 mM ( $\circ$ ) in the presence of high  $[\text{Na}^+]_o$  (90 mM). The responses were first recorded at 2 mM ( $\Delta$ ), then at 10 mM ( $\circ$ ) and finally again at 2 mM ( $\bullet$ )  $[\text{Ca}^{2+}]_o$ .  $\text{Ca}^{2+}$  was replaced with choline. L-glutamate was applied by ionophoresis ( $-35 \text{ nA}$ ,  $50 \text{ msec}$ ; brake current  $5 \text{ nA}$ ). The effect of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  was reversible ( $\bullet$ ). (B) Current-voltage relationship of the glutamate-induced current obtained at 2 mM ( $\bullet$ ), 15 mM ( $\circ$ ) and 50 mM ( $\Delta$ ) extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations ( $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ) in the presence of low  $[\text{Na}^+]_o$  (2 mM).  $\text{Ca}^{2+}$  was replaced with Tris $^+$ . L-glutamate was applied by ionophoresis ( $-35 \text{ nA}$ ,  $50 \text{ msec}$ ; brake current  $5 \text{ nA}$ ). (C) The relationship between the reversal potential and  $[\text{Ca}^{2+}]_o$ . The average ( $\bullet$ ) and standard deviations (short vertical bars) were plotted.  $\text{Ca}^{2+}$  was replaced with Tris $^+$ . The number of examined cells are shown in parentheses.



## 2. Ca イオン

[Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub> が高い状態 (90mM) では、コリン置換によって細胞外 Ca<sup>2+</sup> 濃度 (extracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>) を 2mM から 10mM に増加させることによって、グルタミン酸応答の振幅は 58.6±8.1% (保持電位 = -76mV, n=3) に減少したが、逆転電位は変化しなかった (図 9 A)。このことより [Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub> が高い状態 (90mM) では、Ca<sup>2+</sup> は Na<sup>+</sup> のグルタミン酸が活性化するチャネルの通過を妨げると考えられる。

Tris<sup>+</sup> 置換によって [Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub> を 2mM とした場合には、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> を増加させるのに伴ってグルタミン酸応答の逆転電位はより脱分極の方向に偏移した (2mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> では -25.7±2.8mV, n=9; 10mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> では -18.0±3.0mV, n=8; 50mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> では -2.3±1.7mV, n=4, 図 9 B, C)。これらの結果より細胞外の Ca<sup>2+</sup> が二面的な作用を持つことを示す。すなわち [Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub> が高い場合には細胞外の Ca<sup>2+</sup> は Na<sup>+</sup> がグルタミン酸によって活性化されるチャネルを通過するのを妨げ、[Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub> が低い場合には Ca<sup>2+</sup> もグルタミン酸によって活性化されるチャネルを通過することを意味する。

## 3. K イオン

グルタミン酸が活性化するチャネルに対する K<sup>+</sup> の透過性を調べた。これらの実験では細胞外の Na<sup>+</sup> を Tris<sup>+</sup> によって置換した。[Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub> が 90mM の場合に細胞外 K<sup>+</sup> 濃度 (extracellular K<sup>+</sup> concentration, [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>) を 5mM から 25mM に変化させたが、その前後で有意なグルタミン酸応答の変化は認められな

かった。[Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub> が低い場合 (2mM) には、[K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> を 5mM から 25mM に変化させると、グルタミン酸応答の振幅は増大し (図 10), 逆転電位は -29.0±4.2mV (n=5) から -14.0±3.5mV (n=3) に変化した。これらの結果より、K<sup>+</sup> もまたグルタミン酸が活性化するチャネルを通過することが示された。また電極内液の主な陽イオンを K<sup>+</sup> から Cs<sup>+</sup> に変えても、グルタミン酸応答の逆転電位に有意な変化を認めなかった。

## 4. Cl イオン

Cl<sup>-</sup> は細胞外液の主な陰イオンである。グルタミン酸が活性化するチャネルに対する Cl<sup>-</sup> の透過性を調べるために、細胞外液の Cl<sup>-</sup> をメタネンスルホン酸で置換し、細胞外 Cl<sup>-</sup> 濃度を 2mM としたグルタミン酸応答を調べた。置換前後でグルタミン酸応答の振幅と逆転電位に変化は認められなかった。この結果はグルタミン酸が活性化するチャネルに対する透過性を Cl<sup>-</sup> が持たないことを意味する。

## 5. 各イオン間の透過性の比較

これらの結果よりグルタミン酸によって活性化されるチャネルは各々のアルカリ金属イオンと Ca<sup>2+</sup> を通すことが判明した。このチャネルに対する上記の各イオンの相対的透過性を求めるために、細胞外のイオン環境を Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup> および Ca<sup>2+</sup> のうち 1 種類とし、細胞内のイオン環境を 120mM Cs<sup>+</sup>, 5mM Na<sup>+</sup> とし、その場合のグルタミン酸応答の逆転電位を測定した。細胞外液の浸透圧を一致させるために、1 価の陽イオン濃度を 120mM, Ca<sup>2+</sup> の濃度を 80mM とした。以上のイオン環境

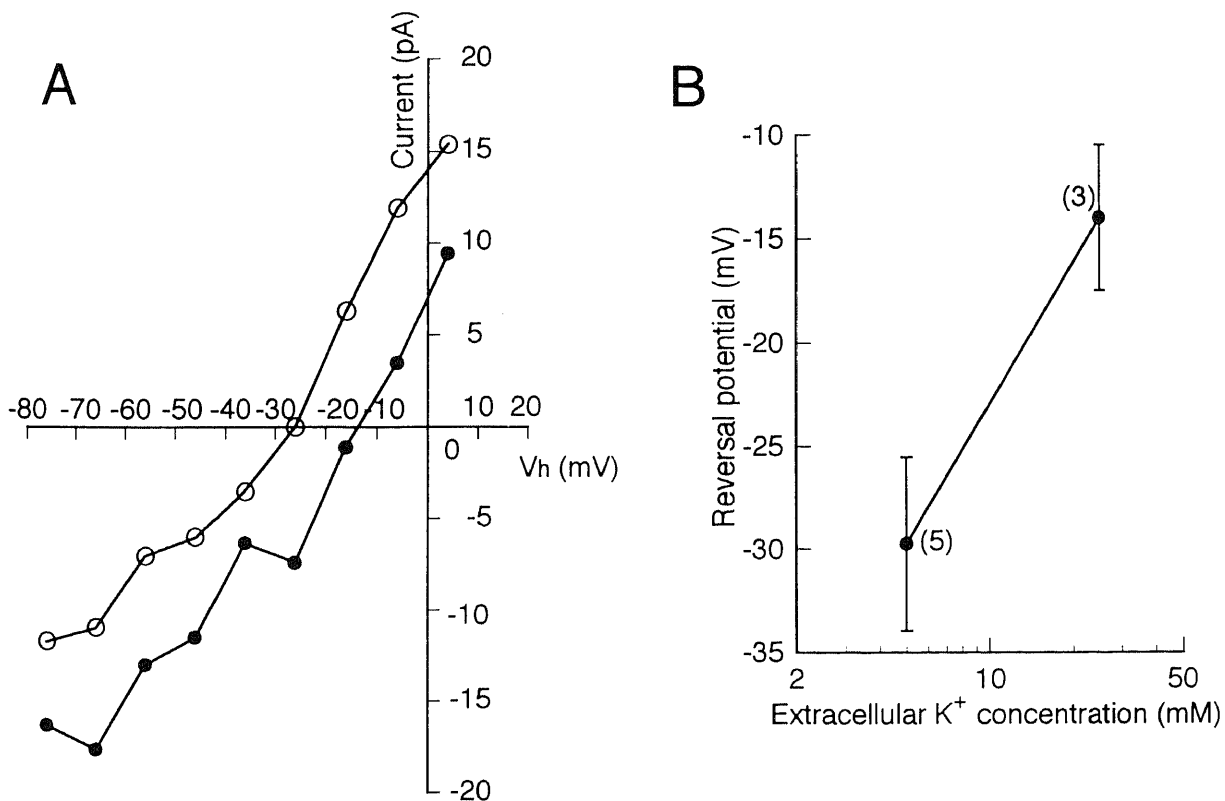


Fig. 10. Effects of extracellular K<sup>+</sup> on the glutamate-induced current. (A) Current-voltage relationship of the glutamate-induced current at extracellular K<sup>+</sup> concentration ([K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>) of 5 (○) and 25 mM (●) in the presence of low [Na<sup>+</sup>]<sub>o</sub> (2 mM). The responses were first recorded at 5 mM, and then at 25 mM [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>. L-glutamate was applied by ionophoresis (-35 nA, 50 msec; brake current 5 nA). K<sup>+</sup> was replaced with Tris<sup>+</sup>. (B) The relationship between the reversal potential and [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>. The average (●) and standard deviations (short vertical bars) were plotted. The number of examined cells are shown in parentheses.

下でのグルタミン酸応答の逆転電位は細胞外の陽イオンが  $K^+$  の場合には  $-8.4 \pm 1.5 \text{ mV}$  ( $n=5$ ),  $Na^+$  の場合には  $-7.0 \pm 1.4 \text{ mV}$  ( $n=4$ ),  $Ca^{2+}$  の場合には  $1.7 \pm 0.6 \text{ mV}$  ( $n=3$ ),  $Cs^+$  の場合には  $0.3 \pm 2.5 \text{ mV}$  ( $n=3$ ) であった。これらの結果よりグルタミン酸が活性化するチャネルの上記の4種の陽イオンに対する選択性は低いことが判明した。得られた  $Na^+$  に対する各陽イオンの透過性の比は  $P_{Na}:P_K:P_{Ca}:P_{Cs}=1:0.94:1.32:0.57$  であった。

## 考　　察

ネコ網膜の双極細胞には2種類ある。一つは錐体双極細胞であり、これにはON型双極細胞とOFF型双極細胞があり、もう一つは杆体双極細胞であり、これはON型双極細胞のみで構成されている。その受容野の中心に光を照射することでON型双極細胞は脱分極し、OFF型双極細胞は過分極する<sup>19,20</sup>。軸索終末はON型双極細胞では内網状層の近位側 (sublamina b) に位置し、OFF型双極細胞では内網状層の遠位側 (sublamina a) に位置する<sup>21</sup>。よって網膜の構造が保たれているかぎり、上記の基準によりON型双極細胞とOFF型双極細胞を区別することができる。しかしネコの双極細胞を単離した後では、単離された双極細胞は視細胞からの入力を失うので光に反応せず、しかも軸索終末の位置に関する情報も失われるので、ON型双極細胞とOFF型双極細胞を形態学的に区別するのは困難であった。この選択を容易にするためのプロテインキナーゼC抗体 (protein kinase C antibody, PKC) を用いた識別法では杆体双極細胞はPKCに対し免疫反応を示しON型細胞であり、PKCに対して免疫反応を示さない双極細胞は錐体双極細胞でON型またはOFF型であることが示された<sup>22,23</sup>が、OFF型双極細胞のみを選択するのは困難であった。

本研究において広範囲の網膜を酵素処理し、任意の双極細胞の膜電位を  $-46 \text{ mV}$  に固定した場合には、測定した双極細胞のうち  $100 \mu\text{M}$  の圧投与されたグルタミン酸ナトリウム溶液に対し内向きの電流応答を示した双極細胞が3%あった。この双極細胞は内向き電流応答を示さなかった双極細胞と比べ大きな細胞体と短い軸索を持っていた。ネコの錐体双極細胞は杆体双極細胞に比べ比較的大きな細胞体と短い軸索を持つものがある<sup>24-26</sup>ので、本研究で調べた大きな細胞体と短い軸索を持つ双極細胞は錐体双極細胞であると考えられる。

暗黒状態において視細胞より放出されたグルタミン酸はON型双極細胞においてはそのcGMP活性化チャネルを閉じることによってON型双極細胞のコンダクタンスを減少させる<sup>5,6,10</sup>。逆にOFF型双極細胞ではそのコンダクタンスを増加させる<sup>11,12</sup>。すなわちグルタミン酸によってコンダクタンスが増大する双極細胞はOFF型双極細胞であるので、膜電位を  $-46 \text{ mV}$  に固定してグルタミン酸に対し内向きの電流応答を示した双極細胞はOFF型双極細胞であると判断した。

OFF型双極細胞のグルタミン酸に対する感受性は樹状突起部に局在していた (図5)。同様の結果がアメリカサンショウウオのOFF型双極細胞にも得られている<sup>13</sup>。ネコ錐体双極細胞の樹状突起は錐体の軸索終末部に位置しており<sup>24,25</sup>、これらの結果からOFF型双極細胞は錐体の光応答による信号を受けるのに適していると考えられる。また他の網膜内神経伝達物質であるグリシンとγ-アミノ酪酸に関してはマウスの双極細胞では軸索終末が最も高い感受性を示すことが報告されている<sup>27</sup>。

グルタミン酸受容体はその薬理学的特性によってイオンチャネル型受容体と代謝型受容体に分類され、さらにイオンチャネル型受容体は薬理学的手法<sup>28</sup>とMgイオンによる電位依存性<sup>29,30</sup>によってNMDA型と非-NMDA型に分類されている。代謝型受容体には6種類のサブタイプが報告されている<sup>31</sup>。多くのイオンチャネル型グルタミン酸受容体がクローニングされているが<sup>32-34</sup>、これらの受容体の詳細な生理的機能は解明されていない。

図6で示すようにOFF型双極細胞のグルタミン酸受容体はカイニン酸とAMPAによって活性化され、NMDA, APB, Asp および 1S, 3R, -ACPD では活性化されず、OFF型双極細胞のグルタミン酸応答はCNQXによって拮抗され、NMDA型受容体の拮抗薬であるAP-7では拮抗されなかった。すなわちネコ網膜OFF型双極細胞のグルタミン酸受容体は非-NMDA型のみで構成されることが判明した。

これまでにクローニングされた非-NMDA型グルタミン酸受容体のうち6番目にクローニングされたものはGluR6と呼ばれ<sup>35-37</sup>、その一部<sup>35-37</sup>は直線的な電圧-応答曲線を示し、そのチャネルの1価陽イオンに対する2価陽イオンの透過性の比が0.47である<sup>37</sup>。本研究で求めたOFF型双極細胞のグルタミン酸によって活性化されるチャネルの相対的透過性は  $P_{Na}:P_{Ca}=1:0.57$  であり、上記の0.47に近似している。したがってOFF型双極細胞のグルタミン酸受容体はGluR6の可能性がある。

OFF型双極細胞のグルタミン酸応答は高濃度 ( $\geq 100 \mu\text{M}$  またはイオン電気泳動法による投与) のグルタミン酸に対し弱い脱感作を示した (図7A)。キンギョの水平細胞の非-NMDA型グルタミン酸応答では脱感作を示さなかったことが報告されており<sup>38,39</sup>、このことからOFF型双極細胞と水平細胞の非-NMDA型グルタミン酸受容体は異なる薬理学的作用を持つ可能性が考えられた。伝達物質に対する脱感作はシナプス後細胞に対し、高い周波数のみを通すフィルターの作用をする。キンギョのON型双極細胞とOFF型双極細胞の光応答を比較した場合にOFF型双極細胞の応答が常に速く、かつ一過性であった<sup>4</sup>。ネコ網膜OFF型双極細胞の光刺激に対する応答の細胞内誘導は技術的に困難であるので、キンギョのOFF型双極細胞の特性<sup>19</sup>をネコのOFF型双極細胞の脱感作を示す特性に適用するならば、速くかつ一過性の光応答は脱感作を示す特性によって説明できると考えられる。

## 結　　論

若いネコにおいて単離した網膜OFF型双極細胞のL-グルタミン酸に対する電流応答をパッチクランプ法を用いて研究し、哺乳類の網膜における視細胞からOFF型双極細胞への信号伝達に関して以下の結果を得た。

1. 調べた1196個の双極細胞のうち119個が膜電位を  $-46 \text{ mV}$  に保持した場合にグルタミン酸に対して内向きの電流応答を生じ、応答を生じた細胞はOFF型双極細胞の形態学的特徴を持っていた。

2. OFF型双極細胞のグルタミン酸に対する応答はグルタミン酸の濃度に依存して増大し、 $100 \mu\text{M}$  のグルタミン酸で応答は飽和し、それ以上の濃度では脱感作を示した。

3. OFF型双極細胞のグルタミン酸に対する感受性は細胞の各部位のうち樹状突起部で最も高かった。

4. 20 $\mu$ M のカイニン酸と 100 $\mu$ M の AMPA はグルタミン酸を投与した場合に類似した作用を示した. 100 $\mu$ M の APB および 1S, 3R, -ACPD は電流応答を惹起しなかった. 100 $\mu$ M の Asp および NMDA は, 灌流液にグリシンを加え Mg イオンを除去しても, 電流応答を生じなかった. 1 $\mu$ M 以上の CNQX はグルタミン酸の作用に拮抗した. よって OFF 型双極細胞のグルタミン酸受容体は NMDA 型や代謝型ではなく, 非-NMDA 型であることが判明した.

5. グルタミン酸が活性化するチャネルはアルカリ金属イオンに対し低い選択性を示し, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup> および Ca<sup>2+</sup> に対し透過性を示した. その透過性の比は P<sub>Na</sub>: P<sub>K</sub>: P<sub>Cs</sub>: P<sub>Ca</sub>=1: 0.94: 1.32: 0.57 であった.

## 謝 辞

稿を終えるに当り, 御指導と御校閲をいただきました恩師河崎一夫教授に深く感謝の意を表します. また本研究の遂行にあたり, 御指導と御協力をいただきました慶応義塾大学医学部の金子章道教授に心より感謝します.

## 文 献

- 1) Ayoub, G. S., Korenbrot, J. I. & Copenhagen, D. R.: Release of endogenous glutamate from isolated cone photoreceptors of the lizard. *Neurosci. Res. Suppl.*, **10**, S47-S56 (1989).
- 2) Copenhagen, D. R. & Jahr, C. E.: Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors. *Nature*, **341**, 536-539 (1989).
- 3) Murakami, M., Ohtsuka, T. & Shimazaki, H.: Effects of aspartate and glutamate on the bipolar cells in the carp retina. *Vision Res.*, **15**, 456-458 (1975).
- 4) Kaneko, A. & Shimazaki, H.: Synaptic transmission from photoreceptors to bipolar and horizontal cells in the carp retina. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **40**, 537-546 (1976).
- 5) Villa, P., Kurahashi, T. & Kaneko, A.: L-glutamate-induced responses and cyclic GMP-activated channels in three subtypes of retinal bipolar cells dissociated from the cat. *J. Neurosci.*, **15**, 3571-3582 (1995).
- 6) Shiells, R. A. & Falk, G.: Glutamate receptors of rod bipolar cells are linked to a cyclic GMP cascade via a G-protein. *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.*, **242**, 91-94 (1990).
- 7) Shiells, R. A. & Falk, G.: The glutamate-receptor linked cGMP cascade of retinal on-bipolar cells is pertussis and cholera toxin-sensitive. *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.*, **247**, 17-20 (1992).
- 8) Shiells, R. A. & Falk, G.: Properties of the cGMP-activated channel of retinal on-bipolar cells. *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.*, **247**, 21-25 (1992).
- 9) Yamashita, M. & Wässle, H.: Responses of rod bipolar cells isolated from the rat retina to the glutamate agonist 2-amino-4-phosphonobutyric acid (APB). *J. Neurosci.*, **11**, 2372-2382 (1991).
- 10) Nawy, S. & Jahr, C. E.: Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells. *Nature*, **346**, 269-271 (1990).
- 11) Attwell, D., Mobbs, P., Tessier-Lavigne, M. & Wilson, M.: Neurotransmitter-induced currents in retinal bipolar cells of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *J. Physiol.*, **387**, 125-161 (1987).
- 12) Hirano, A. A. & MacLeish, P. R.: Glutamate and 2-amino-4-phosphonobutyrate evoke and increase in potassium conductance in retinal bipolar cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 805-809 (1991).
- 13) Gilbertson, T. A., Scobey, R. & Wilson, M.: Permeation of calcium ions through non-NMDA glutamate channels in retinal bipolar cells. *Science*, **251**, 1613-1615 (1991).
- 14) Kaneko, A., Pinto, L. H. & Tachibana, M.: Transient calcium current of retinal bipolar cells of the mouse. *J. Physiol.*, **410**, 613-629 (1989).
- 15) Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J.: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.*, **391**, 85-100 (1981).
- 16) Tachibana, M. & Kaneko, A.:  $\gamma$ -Aminobutyric acid exerts a local inhibitory action on the axon terminal of bipolar cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 3501-3505 (1987).
- 17) Kaneko, A. & Tachibana, M.: Effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid on isolated cone photoreceptors of the turtle retina. *J. Physiol.*, **373**, 443-461 (1986).
- 18) Hille, B.: *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 2nd ed., p341-345, Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, 1992.
- 19) Kaneko, A.: Physiological and morphological identification of horizontal, bipolar and amacrine cells in goldfish retina. *J. Physiol.*, **207**, 623-633 (1970).
- 20) Werblin, F. S. & Dowling, J. E.: Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording. *J. Neurophysiol.*, **32**, 339-355 (1969).
- 21) Famiglietti, E. V., Kaneko, A. & Tachibana, M.: Neuronal architecture of on and off pathways to ganglion cells in carp retina. *Science*, **198**, 1267-1269 (1977).
- 22) Suzuki, S. & Kaneko, A.: Protein kinase C-like immunoreactivity of the on-type bipolar cell in goldfish and mammalian retinas: a useful criterion for subtype identification of isolated cells. *Neurosci. Res. Suppl.*, **15**, S107-S115 (1991).
- 23) Greferath, U., Grünert, U. & Wässle, H.: Rod bipolar cells in the mammalian retina show protein kinase C-like immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.*, **301**, 433-442 (1990).
- 24) Boycott, B. B. & Kolb, H.: The connections between bipolar cells and photoreceptors in the retina of the domestic cat. *J. Comp. Neurol.*, **148**, 91-114 (1973).
- 25) Kolb, H., Nelson, R. & Mariani, A.: Amacrine cells, bipolar cells and ganglion cells of the cat retina: a Golgi study. *Vision Res.*, **21**, 1081-1114 (1981).

- 26) McGuire, B. A., Stevens, J. K. & Sterling, P.: Microcircuitry of bipolar cells in cat retina. *J. Neurosci.*, **4**, 2920-2938 (1984).
- 27) Suzuki, S., Tachibana, M. & Kaneko, A.: Effects of glycine and GABA on isolated bipolar cells of the mouse retina. *J. Physiol.*, **421**, 645-662 (1990).
- 28) Honoré, T., Davies, S. N., Drejer, J., Fletcher, E. J., Jacobsen, P., Lodge, D. & Nielsen, F. E.: Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists. *Science*, **241**, 701-703 (1988).
- 29) Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, H. & Prochiantz, A.: Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature*, **307**, 462-465 (1984).
- 30) Mayer, M. L., Westbrook, G. L. & Guthrie, P. B.: Voltage-dependent block by  $Mg^{2+}$  of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, **309**, 261-263 (1984).
- 31) Nakanishi, S.: Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*, **258**, 597-603 (1992).
- 32) Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Rogers, S. W. & Heinemann, S.: Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature*, **342**, 643-648 (1989).
- 33) Keinänen, K., Wisden, W., Sommer, B., Werner, P., Herb, A., Verdoorn, T. A., Sakmann, B. & Seeburg, P. H.: A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science*, **249**, 556-560 (1990).
- 34) Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N. & Nakanishi, S.: Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*, **354**, 31-37 (1991).
- 35) Egebjerg, J., Bettler, B., Hermans-Borgmeyer, I. & Heinemann, S. F.: Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. *Nature*, **351**, 745-748 (1991).
- 36) Dingledine, R., Hume, R. I. & Heinemann, S. F.: Structural determinants of barium permeation and rectification in non-NMDA glutamate receptor channels. *J. Neurosci.*, **12**, 4080-4087 (1992).
- 37) Egebjerg, J. & Heinemann, S. F.:  $Ca^{2+}$  permeability of unedited and edited versions of the kainate selective glutamate receptor GluR6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90**, 755-759 (1993).
- 38) Ishida, A. T., Kaneko, A. & Tachibana, M.: Responses of solitary retinal horizontal cells from *Carassius auratus* to L-glutamate and related amino acid. *J. Physiol.*, **348**, 255-270 (1984).
- 39) Tachibana, M.: Permeability changes induced by L-glutamate in solitary retinal horizontal cells isolated from *Carassius auratus*. *J. Physiol.*, **358**, 153-167 (1985).

**L-glutamate-induced Responses in Off-type Bipolar Cells of the Cat Retina** Tsugihisa Sasaki Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., **104**, 529—540 (1995)

**Key words** L-glutamate, off-type bipolar cell, non-NMDA receptor, retina

#### Abstract

L-glutamate-induced current response was studied in isolated off-type bipolar cells dissociated from the retina of young adult cats. Bipolar cells with morphological characteristics for off-type cells were selected. Current responses were recorded from these cells by the patch clamp technique in the whole-cell configuration. In 119 out of 1196 screened samples glutamate induced an inward current (holding voltage, -46 mV). Sensitivity to glutamate was highest at the dendritic region of the cell. Kainate and  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) worked as potent agonists. Neither 2-amino-4-phosphonobutyrate (APB), L-aspartate (Asp), (1S,3R)-1-amino-cyclopentane-1,3-dicarboxylic acid (1S,3R, -ACPD), nor N-methyl-D-aspartate (NMDA) (all at 100  $\mu$ M) was effective even in the presence of glycine and in  $Mg^{2+}$ -free solution. The glutamate-induced response was antagonized by 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) at the concentration of 1  $\mu$ M or higher. The glutamate-activated channel was a cationic channel with low selectivity to alkaline metal ions.  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cs^+$  and  $Ca^{2+}$  were permeable through the glutamate-activated channel. The permeability ratio of some cations was  $P_{Na}:P_K:P_{Cs}:P_{Ca}=1:0.94:1.32:0.57$ . These findings suggest off-type bipolar cells have a non-NMDA receptor channel permeable to alkaline metal ions with low selectivity but do not have NMDA or metabotropic receptors.